Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 2, June. July. 2021, p. 409- 421

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۰ ص.۴۲۱-۴۰۹

مقاله پژوهشی

ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی گرده گل با کنستانتره پروتئین آب پنیر و فایبرزول و بررسی پایداری و ساختاری ریزکپسول‌ها

حسین محب‌الدینی*[۱]- عاطفه مقصودلو[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۰۶

چکیده

ریزپوشانی پروتئین‌ها و پپتیدها در حفظ ساختار و ویژگی‌های عملکردی آنها تاثیرگذار است. در این پژوهش به‌منظور حفظ ساختار و پایداری پروتئین هیدرولیز شده گرده گل در مقابل عوامل تخریب کننده، ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده توسط خشک‌کن پاششی با کنستانتره پروتئین آب پنیر (WPC) و فایبرزول و مخلوط آنها انجام شد. ترکیب دیواره و پودر پروتئین هیدرولیز شده با نسبت ۱۰ به ۱ وزنی- وزنی استفاده شدند. ترکیب مورد استفاده برای دیواره شاملWPC ۲ درصد، فایبرزول ۲ درصد، همچنین مخلوط WPC و فایبرزول با نسبت ۱ به ۳ بود. به‌منظور تسریع واکنش‌های اکسایشی، کپسول‌های حاصله به مدت ۴۸ ساعت در معرض اشعه UV قرار گرفتند. بیشترین میزان مهارکنندگی رادیکال (DPPH) در مدت در معرض قرار گیری اشعه UV مربوط به کپسول با دیواره مخلوط فایبرزول و WPC بود. نتایج طیف‌سنجی (FTIR) نشان داد دیواره ترکیبی فایبرزول و WPC بهترین عملکرد را در حفظ ساختار شیمیایی کپسول‌ها داشته است. تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM) نشان داد ریزکپسول‌هایی که دارای دیواره مخلوط فایبرزول و WPC بودند، دیواره یکنواخت و صاف‌تری نسبت به ریزکپسول‌های با دیواره فایبروزلی بودند. در نهایت مخلوط WPC و فایبرزول به‌عنوان بهترین دیواره با قابلیت محافظتی مناسب به‌منظور ریزپوشانی پروتئین‌های هیدرولیز شده و محافظت از آنها در مقابل عوامل تخریب کننده انتخاب گردید.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده گرده، ریزپوشانی، خشک‌کن پاششی، فایبرزول، کنستانتره پروتئین آب پنیر

مقدمه

اکثر ترکیبات پروتئینی مانند داروها و غذا داروها به دلیل حساسیت آنها به شرایط اسیدی معده و روده، دناتوره شده و اثربخشی خود را از دست می‌دهند (Kanbargi *et al*., 2017). ریزپوشانی این ترکیبات در حفظ ساختار و ویژگی‌های عملکردی آنها تاثیرگذار است. گرده گل حاوی ۱۰ تا ۴۰ درصد پروتئین است. با توجه به ویژگی‌های عملکردی و سلامتی بخشی پروتئین‌های گرده گل، منبع پروتئینی ارزشمندی به‌شمار می‌آید. با انجام عمل هیدرولیز و تولید پپتیدهای زیست‌فعال، اثرات سلامتی‌بخشی و عملکردی آنها افزایش می‌یابد (Maqsoudlou *et al*., 2018). تاکنون روش‌های گوناگونی به‌منظور ریزپوشانی ترکیبات پروتئینی و پپتیدی مورد استفاده قرار گرفته است. استفاده از خشک‌کن پاششی رایج‌ترین روش حفظ مواد فعال و حساس غذایی از جمله پروتئین‌ها و پپتیدها است که موجب افزایش پایداری این ترکیبات می‌شود (Su *et al*., 2011 ؛Patsialas *et al*., 2012). موادی که به‌عنوان دیواره یا پوشش در ریزپوشانی با خشک‌کن پاششی به‌کار می‌روند شامل صمغ عربی، مالتودکسترین، فایبرزول، نشاسته‌های تغییر یافته و مخلوط آنها، ایزوله‌ها و کنستانتره‌های پروتئینی مثل پروتئین آب پنیر و پروتئین سویا می‌باشند (Shen and Quek, 2014). فایبرزول نوعی فیبر رژیمی است که قابلیت استفاده در بسیاری از مواد غذایی و مکمل‌های غذایی را دارد. این ترکیب کربوهیدراتی در واقع مالتودکسترین مقاوم به هضم بوده و اخیرا در عملیات ریزپوشانی به‌عنوان ماده دیواره‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد (Zhong *et al*., 2015). به‌عنوان مثال Pudziuvelyte و همکاران (۲۰۱۹) فایبرزول را به‌عنوان یکی از ترکیبات دیواره‌ای در ریزپوشانی عصاره‌های فنلی توسط تکنیک خشک کردن پاششی مورد استفاده قرار دادند. آنها اعلام کردند که فایبرزول عملکرد خوبی در حفظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۱- دکترای علوم دامی، گروه تغذیه زنبور عسل، عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل.
۲- دانش‌آموخته دکتری، گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
(*-نویسنده مسئول: Email: h.mohebodini@uma.ac.ir)
DOI: 10.22067/ifstrj.v17i2.86412

عصاره‌های فنلی و همچنین افزایش بازدهی ریزپوشانی از خود نشان داد. در کار پژوهشی دیگر Pai و همکاران (۲۰۱۵) از فایبرزول به‌عنوان ماده دیواره‌ای در ریزپوشانی نارنجین استفاده کردند که باعث افزایش بازدهی ریزپوشانی و حفظ ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ریزکپسول‌ها گردید. پژوهشگران از ترکیبات دیواره‌ای مختلفی به‌منظور ریزپوشانی پروتئین‌ها و پپتیدها استفاده کرده‌اند و پایداری و ویژگی‌های ساختاری آنها را مورد بررسی قرار داده‌اند. Molina و همکاران (۲۰۰۹) کازئین هیدرولیز شده را با استفاده از ایزوله پروتئینی سویا، به روش خشک کردن پاششی ریزپوشانی کردند. نتایج بررسی ساختار بیرونی کپسول‌ها توسط SEM نشان داد که ریزکپسول‌های تولید شده ساختاری کروی و فاقد خراش، ترک یا شکستگی داشتند و باعث محافظت مناسب مواد داخلی ریزکپسول‌ها گردید. Kanbargi و همکاران (۲۰۱۷) به‌منظور ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از دانه *Ziziphus jujube* از سدیم آلژینات به‌عنوان ماده دیواره‌ای استفاده کردند. نتایج نشان داد با افزایش مدت زمان نگهداری، قدرت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده به شدت کاهش یافت، اما قدرت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده ریزپوشانی شده تقریبا ثابت ماند. نتایج طیف‌سنجی FTIR نشان داد که پیوندهای عرضی بین پپتیدها و سدیم آلژینات برقرار شده بود. نتایج بررسی مرفولوژیکی با استفاده از SEM نشان داد سطح ریزکپسول‌های تولید شده، صاف‌تر، کروی‌تر و یکنواخت‌تر بود.

Mohan و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از لیپوپروتئین سویا به ریزپوشانی وی پروتئین هیدرولیز شده پرداختند. مقایسه نتایج طیف‌سنجی FTIR نشان داد پپتیدهای آبگریز با بخش لیپیدی دیواره و پپتیدهای آبدوست با بخش پروتئینی و قطبی دیواره پیوند برقرار کردند. Torres-Giner و همکاران (۲۰۱۷) به‌منظور ریز پوشانی عصاره آلوورا از کنستانتر وی پروتئین و مالتودکسترین استفاده کردند. آنها از اشعه UV به‌عنوان یک عامل تسریع‌کننده واکنش‌های اکسایشی و بررسی مقاومت ریزکپسول‌ها پرداختند. نتایج FTIR نشان داد الحاق پلی‌ساکارید و پروتئین باعث کاهش شدت جذب مربوط به باند کششی C-H گردید. از طرفی در ساختار شیمیایی کنستانتره پروتئین آب پنیر به تنهایی و همچنین عصاره ریزپوشانی شده با آن، با قرارگیری در معرض UV تغییر قابل توجهی حاصل نشد. نتایج بررسی مرفولوژیکی ریزکپسول‌ها نشان داد کپسول‌های تهیه شده با دیواره پروتئینی و ترکیب پروتئین و کربوهیدرات سطح صاف‌تر، بدون چروک‌تر و با استقامت تری داشتند. Su و همکاران (۲۰۱۱) از ترکیب آلژینات و کلاژن به‌عنوان ماده دیواره‌ای کپسول استفاده کردند. نتایج بررسی مرفولوژیکی ریزکپسول‌ها با استفاده از SEM نشان داد ساختار ریزکپسول‌ها کروی بود و با افزایش نسبت پروتئین به کربوهیدرات در دیواره، تعداد ترک‌های دیواره کاهش یافت و ساختار میکروذرات مقاوم‌تر گردید. نتایج طیف‌سنجی FTIR نشان داد کلاژن و سدیم آلژینات از طریق پیوند هیدروژنی بین مولکولی و نیروی الکتروستاتیک با یکدیگر ترکیب شده و ماتریکس بسیار مقاومی در دیواره ریزکپسول‌ها به وجود آوردند. ترکیب شدن پروتئین و کربوهیدرات باعث تغییر در محل و شدت باندهای مربوط به ساختارهای دوم پروتئین گردید.

Gómez-Mascaraque و López-Rubio (۲۰۱۶) ویژگی مرفولوژیکی ریزکپسول‌های حاصل از ریزپوشانی پروتئین آب پنیر هیدرولیز شده به روش خشک کردن پاششی با ژلاتین و کیتوزان را با استفاده از SEM مورد بررسی قرار دادند. ساختار ریزکپسول‌های حاصله تقریبا کروی بوده و از نظر میزان صاف بودن سطح، غیریکنواخت بودند. آنها بیان داشتند که این غیریکنواختی معمولا در ذرات حل شده در محلول‌های آبی که با استفاده از خشک‌کن پاششی خشک شده‌اند معمول است.

علیرغم اینکه پژوهش‌های مختلفی در زمینه ریزپوشانی ترکیبات غذایی زیست‌فعال انجام شده است، مطالعات در مورد ریزپوشانی پروتئین‌های هیدرولیزشده و بررسی پایداری آنها در شرایط تسریع یافته کم است؛ از طرف دیگر محصولات جانبی زنبور عسل از جمله گرده در کشور ایران کمتر مورد توجه قرار گرفته است. این مسئله ضرورت انجام این پژوهش را روشن می‌کند. بنابراین هدف از انجام این پژوهش ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده گرده گل توسط خشک‌کن پاششی با فایبرزول و کنستانتره آب پنیر به‌منظور حفظ ساختار و پایداری ریزکپسول‌های حاصله در شرایط تسریع یافته می‌باشد. در این راستا بررسی پایداری ریزکپسول‌ها با استفاده از آزمون آنتی‌اکسیدانی، بررسی ساختار شیمیایی و برهم‌کنش‌های شیمیایی بین ماده دیواره‌ای و پروتئین هیدرولیز شده کپسوله شده با استفاده از FTIR و بررسی ساختار مرفولوژیکی ریزکپسول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی رویشی انجام گردید.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی پروتئین هیدرولیز شده

این پژوهش در سال ۱۳۹۸ در دانشگاه محقق اردبیلی و موسسه فناوری کشاورزی و مواد غذایی (IATA) شهر والنسیا در کشور اسپانیا انجام شد. گرده گل از مرکز پرورش زنبور عسل و خدمات گرده افشانی واقع در استان اردبیل تهیه شد. پودر گرده با استفاده از هگزان با نسبت ۱ به ۳ به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی چربی‌زدایی شد (Maqsoudlou *et al*., 2018) . به‌منظور هیدرولیز آنزیمی، گرده چربی‌زدایی شده (با ۱۴/۵ درصد پروتئین) در فسفات باقر ۰/۱ مولار (۸ pH) با نسبت ۱ به ۵ حل شد و با استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک هموژن گردید. هیدرولیز آنزیمی گرده چربی‌زدایی شده با استفاده از آلکالاز (غلظت ۱/۵ درصد) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ به مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار انجام شد. در نهایت واکنش آنزیمی

در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف گردید. به‌منظور حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ با دور g ۴۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از جمع‌آوری سوپرناتانت، با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک گردید (Maqsoudlou *et al*., 2018).

تهیه مخلوط‌های پروتئینی هیدرولیز شده و مواد دیواره

محلول‌های فایبرزول ۲ درصد، WPC[2] ۲ درصد، همچنین محلول حاوی مخلوط فایبرزول وWPC با نسبت ۳ به ۱، با غلظت کلی (ترکیب دیواره) ۲ درصد وزنی- وزنی در آب دیونیزه تهیه شدند. به این منظور ابتدا پودر پروتئین هیدرولیز شده با نسبت ۱ به ۱۰ وزنی- وزنی نسبت به ترکیب دیواره، به آب دیونیزه اضافه شد و با استفاده از همزن مغناطیسی به مدت ۲ ساعت هم زده شد. سپس مواد دیواره‌ای با نسبت‌های گفته شده به آرامی اضافه شدند و هم‌زدن به مدت ۴ تا ۵ ساعت تا رسیدن به محلولی یکنواخت ادامه یافت (Gómez-Rosenberg *et al*., ؛Mascaraque and López-Rubio, 2016 2016).

خشک کردن با خشک‌کن پاششی

مخلوط‌های پروتئینی هیدرولیز شده و مواد دیواره تهیه شده، با استفاده از یک خشک‌کن پاششی (Butchi ،B90، سوئیس) با دمای ورودی ۱۰۰درجه سانتی‌گراد و دمای خروجی ۵۳ درجه سانتی‌گراد، سرعت جریان هوای۱۴۰ لیتر در دقیقه و فشار ۴ بار خشک شدند. پس از جمع آوری پودر ریزکپسول‌های حاصله، به‌منظور جلوگیری از جذب رطوبت، پودرهای حاصله تا زمان انجام آزمون‌های مورد نظر در داخل دسیکاتور و در دمای اتاق دور از نور مستقیم نگهداری شدند (Gómez-Mascaraque and López-Rubio, 2016).

قرار گیری در معرض اشعه UV

به‌منظورتسریع اکسایش پروتئین هیدرولیز شده و بررسی پایداری ریزکپسول‌ها در برابر عوامل تخریبی، براساس روش Torres-Giner و همکاران (۲۰۱۷)، از اشعه UV به‌عنوان یک عامل تسریع کننده اکسایش استفاده شد. بر اساس این روش ریزکپسول‌های تولید شده، ماده دیواره‌ای و هسته به‌طور جداگانه به مدت ۴۸ساعت در معرض اشعه UV قرار گرفتند.

طیف‌سنجی

با استفاده از طیف‌سنجی FTIR انواع پیوندهای فیزیکوشیمیایی و برهم‌کنش‌های بین ترکیبات پروتئین هیدرولیز شده و فایبرزول و WPC مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت. در این سیستم طیف‌های تکی و منفرد از مواد با میانگین ۲۰ اسکن با دقت ۴ cm^{-1} در محدوده ۴۰۰ cm^{-1} تا ۴۰۰۰ cm^{-1} جمع‌آوری شدند (Torres-Giner *et al*., 2017).

بررسی ویژگی ضداکسایشی ریزکپسول‌ها

ویژگی ضد اکسایشی ریزکپسول‌ها و پروتئین هیدرولیزشده در طی قرارگیری در معرض اشعه UV در ساعت‌های صفر، یک، دو، سه، پنج، هفت، نه، یازده و چهل و هشت اندازه‌گیری و روند تغییرات آنها با یکدیگر مقایسه گردید (Torres-Giner *et al*., 2017). ویژگی ضداکسایشی بر اساس اندازه‌گیری قدرت مهار رادیکال DPPH طبق روش Hmidet و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد.

بررسی ویژگی مرفولوژیکی ریزکپسول‌ها

مرفولوژی ریزکپسول‌های به‌دست آمده بر اساس روش Torres-Giner و همکاران (۲۰۱۷) با استفاده از SEM[3] و توسط میکروسکوپ الکترونی مدل S-4800- Hitachi (Tokyo, Japan) مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه‌گیری راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی بر اساس روش Muangrat و همکاران (۲۰۱۹) با کمی تغییرات انجام شد. ۱۰۰ میلی‌گرم از پودر ریزپوشانی شده با ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم 0.1 M (pH ۸) مخلوط شد و با استفاده از وورتکس به مدت ۱۵ دقیق هم زده شد. به منظور اندازه‌گیری میزان پروتئین سطحی (SPC[4]) در پودر ریزپوشانی شده از روش بردفورد استفاده شد. اندازه گیری راندمان ریزپوشانی (EE%) از معاله (۱) استفاده گردید.

TPC[5] در این معادله میزان پروتئین کل در محلول پروتئینی قبل از فرایند ریزپوشانی را نشان می‌دهد (µg/mL).

SPC در این معادله میزان پروتئین در سطح پودر بعد از فرایند ریزپوشانی را نشان می‌دهد (µg/mL).

$$\text{(EE\%) راندمان ریزپوشانی} = \frac{TPC-SPC}{TPC} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمون آنتی‌اکسیدانی به صورت طرح کاملا تصادفی برای پروتئین هیدرولیز شده، ترکیب فایبرزول و پروتئین هیدرولیز شده، ترکیب فایبرزول، WPC و پروتئین هیدرولیز

2 - Whey protein concentrate
3 Scanning Electron Microscopy
4 Surface protein content
5 Total protein content

شده و ترکیب WPC و پروتئین هیدرولیز شده در هر زمان و همچنین در کل مدت زمان نگهداری برای هر تیمار، به‌صورت جداگانه انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها نیز از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۵ استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل (۲۰۱۳) تهیه گردیدند.

نتایج و بحث

مهار رادیکال DPPH ریزکپسول‌ها

نمودار مقایسه میانگین فعالیت مهار رادیکال ریزکپسول‌های تولید شده و روند تغییرات آن در طول دوره در معرض قرار گیری اشعه UV به‌عنوان عامل مخرب در جدول۱ نشان داده شده است. تقریبا در تمامی زمان‌ها کپسول با دیواره مخلوط فایبرزول و WPC به‌طور معنی‌داری بیشترین میزان مهارکنندگی رادیکال رادشت. بعد از آن کپسول با دیواره WPC با اختلاف معنی‌داری بیشترین مهارکنندگی رادیکال را از خود نشان داد (P<۰/۰۵). این مسئله را می‌توان به قابلیت مهار رادیکال DPPH در WPC نسبت داد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی ترکیب دیواره‌های مورد استفاده نشان داد هیچ یک از دیواره‌ها قابلیت مهار رادیکال DPPH را نداشتند به جز WPC که میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH آن ۲۱٪ بود. برخی از پژوهشگران که معتقد هستند عملیات خشک کردن در طی فرآیند ریزپوشانی ممکن است باعث تخریب ساختار پپتیدهای موجود در داخل کپسول و کاهش فعالیت ضداکسایشی آنها گردد. هرچه نسبت ماده دیواره به هسته بیشتر باشد، کارایی کپسول در حفظ مواد هسته بیشتر خواهد بود (Kanbargi *et al.*, 2017 ؛Sonawane and Arya, 2015). در پژوهش حاضر با به‌کارگیری نسبت ماده دیواره به هسته ۱۰ به ۱ امکان حفاظت مناسب هسته در مقابل عامل تخریبی اشعه UV فراهم گردید؛ به‌جز کپسول با دیواره فایبرزول که میزان فعالیت ضداکسایشی آنها در زمان صفر کمتر از پروتئین هیدرولیز شده بود، عملیات خشک کردن در فرایند ریزپوشانی، تاثیر سوئی بر فعالیت ضد اکسایشی پروتئین هیدرولیز شده موجود در هسته بقیه کپسول‌ها نداشت. در واقع بر اساس مشاهدات می‌توان گفت ترکیب WPC با فایبرزول باعث افزایش کارایی آن در محافظت از هسته شد. در پژوهش‌های پیشین نیز مشخص شده است که حضور پروتئین آب پنیر در ترکیب امولسیونی دیواره و هسته به‌عنوان یک امولسیفایر عمل کرده و کپسول‌هایی با کارایی بالا و دارای قابلیت محافظتی مناسب در مقابل عوامل اکسیدکننده تولید می‌کند (Shen and Quek, 2014؛ Chen *et al.*, 2013).

جدول ۱- مقایسه میانگین تغییرات DPPH ریز کپسول‌های در معرض UV در گذر زمان.

زمان (ساعت)	پروتئین هیدرولیز شده			ریزکپسول‌های با دیواره WPC			ریزکپسول‌های با دیواره ترکیب WPC و فایبرزول			ریزکپسول‌های با دیواره فایبرزول		
صفر	A	b	۸۸/۲۹±۰/۰۶۲	B	c	۸۸/۱۲ ±۰/۰۳۲	A	a	۸۹/۶۷ ± ۰/۳۹	AB	d	۸۵/۰۹ ± ۰/۱۷
۱	D	d	۸۰/۸۲±۰/۰۷۱	e	b	۸۵/۷۲ ±۰/۰۸۹	D	a	۸۷/۸۲ ± ۰/۱۷	E	c	۸۲/۷۸ ± ۰/۲۰۸
۲	B	d	۸۲/۳۳±۰/۲۳	C	b	۸۷/۶۷ ±۰/۰۹۲	A	a	۸۹/۶۱ ± ۰/۳۵	D	c	۸۳/۶۹ ± ۰/۰۷۸
۳	D	d	۸۰/۶۶±۰/۱۴۵	C	b	۸۷/۷۱ ± ۰/۲۱	C	a	۸۸/۴۲ ± ۰/۱۹	E	c	۸۲/۶۸ ± ۰/۳۳۴
۵	C	d	۸۱/۵۳±۰/۱۷۱	A	b	۸۸/۴۵ ±۰/۰۹۳	C	a	۸۸/۵۶ ± ۰/۰۷۸	B	c	۸۴/۸۶ ± ۰/۱۵
۷	D	d	۸۰/۶۹±۰/۱۷	C	b	۸۷/۶۳± ۰/۲۰۱	B	a	۸۹/۱۸ ±۰/۱۹	C	c	۸۳/۹۲ ± ۰/۰۹۶
۹	C	d	۸۱/۶۹±۰/۰۷۶	D	a	۸۷/۰۲ ± ۰/۱۲	E	b	۸۶/۱۷ ± ۰/۱۸	F	c	۸۲/۱۴ ± ۰/۲۲
۱۱	E	d	۷۷/۷۳±۰/۰۵۲	F	b	۸۵/۸۲ ±۰/۰۸۹	C	a	۸۸/۴۹ ± ۰/۱۴	D	c	۸۳/۵۸ ± ۰/۰۵۸
٤۸	F	d	۶۵/۶۲±۰/۲۱	E	b	۸۶/۰۶ ± ۰/۱۷	E	a	۸۶/۲۰ ± ۰/۰۷۸	A	c	۸۵/۴ ± ۰/۰۶

میانگین‌های با حروف انگلیسی کوچک یکسان برای تیمارهای مختلف در یک زمان مشخص تفاوت معنی‌دار ندارند (**P** <۰/۰۵)

میانگین‌های با حروف انگلیسی بزرگ یکسان برای یک تیمار مشخص در زمان‌های مختلف تفاوت معنی دار ندارند (**P** <۰/۰۵)

فعالیت مهار رادیکال WPC و فایبرزول در زمان صفر (شروع)، به‌ترتیب ۲۱ درصد و صفر بود.

در طول دوره انجام این آزمون، BHT به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و فعالیت مهارکنندگی آن همواره بالای ۹۰٪ اندازه گیری شد. با بررسی دقیق‌تر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH کپسول‌ها در طول مدت زمان، معلوم شد که اشعه UV در فعالیت مهار رادیکال DPPH کپسول‌ها تغییری ایجاد نکرده است . اما در ساعت یازدهم و چهل و هشتم در معرض قرارگیری اشعه UV، کاهش واضح و معنی‌داری در فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH هیدرولیز شده‌های پروتئینی به تنهایی مشاهده شد. با مشاهده این تفاوت بین فعالیت

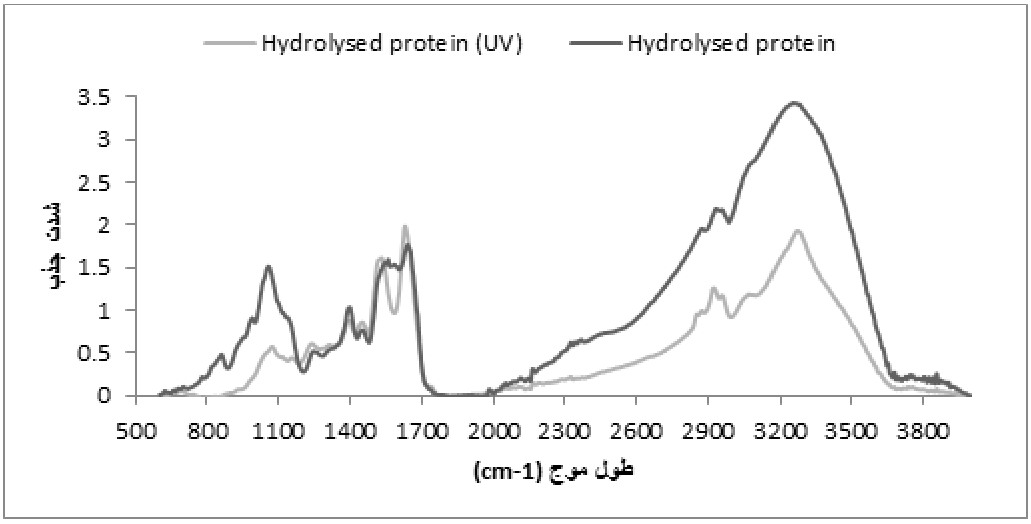
مهارکنندگی رادیکال DPPH هیدرولیزشده‌های پروتئینی کپسوله شده و کپسوله نشده، می‌توان به کارا بودن و نقش محافظتی دیواره‌ها به‌عنوان پوششی مناسب در حفظ ساختار هیدرولیز شده‌های پروتئینی و در نتیجه حفظ ویژگی عملکردی آنها پی برد. این نتایج با آنچه Kanbargi و همکاران (۲۰۱۷)، مظفری و همکاران (۲۰۰۶) و Zavareze و همکاران (۲۰۱۴) در این زمینه بیان کردند مطابقت داشت.

بررسی ساختاری کپسول‌ها با استفاده از FTIR

ارزیابی ساختار شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده و ریزکپسول‌های تولید شده با استفاده از طیف‌سنجی FTIR صورت پذیرفت. شکل ۱ نمودار FTIR پروتئین هیدرولیز شده در شرایط قبل و بعد از قرارگیری آن در معرض اشعه UV را نشان می‌دهد. در محدوده cm^{-1} ۸۵۰ پیک کوچکی با میزان جذب ۰/۵ مشاهده شد که احتمالا مربوط به باندهای آمیدی از جمله N-H، C-N و C=O است. زیرا ثابت شده است که باندهای مربوط به گروه آمیدی در ناحیه cm^{-1} ۱۸۰۰ –۸۰۰ تشکیل می‌شود (Van der Ven *et al.*, 2002)، بنابراین پیکی که در محدوده cm^{-1} ۱۰۵۰–۱۰۰۰ با جذب حدود ۱/۵ مشاهده شد را می‌توان به گروه‌های آمیدی نسبت داد.

در محدوده cm^{-1} ۱۴۵۰– ۱۴۰۰ پیکی با جذب حدود ۱ مشاهده شد. حضور احتمالی یکی از سه باند خمشی نامتقارن CH_3، کشش متقارن CO_3^- و ارتعاشات مربوط به حلقه که به‌ترتیب به اسیدهای آمینه آزاد والین، گلوتامیک اسید و فنیل آلانین نسبت داده شده اند، را می‌توان دلیل ایجاد این پیک در این ناحیه دانست (Pavia *et al.*, 2002). به هر صورت حضور اسیدهای آمینه آزاد در هیدرولیز شده‌های پروتئینی دور از انتظار نبود.

در محدوده cm^{-1} ۱۷۰۰– ۱۵۰۰ پیکی با جذب ۱/۵ تا ۲ مشاهده شد که می‌توان به گروه آمیدی نسبت داد. ارتعاش آمید I که مربوط به باند C=O می‌باشد، در محدوده cm^{-1} ۱۷۰۰–۱۶۰۰جذب دارد و ارتعاش آمید II که مربوط به باندهای N-H و C-N می‌باشد، در محدوده cm^{-1} ۱۶۰۰–۱۵۰۰جذب دارد (Van der Ven *et al.*, 2002) که با نظر بسیاری از پژوهشگران مطابقت دارد (Wang *et al.*, 2013؛ اسدپور و همکاران، ۲۰۱۶؛ Torres-Giner *et al.*, 2017؛ Kanbargi *et al.*, 2017؛ شیرازی و همکاران، ۱۳۸۴). Pavia و همکاران (۲۰۰۲) جذب در این ناحیه را بیان‌کننده ساختار صفحه‌ای بتا و مارپیچ آلفا دانستند که ساختمان دوم پروتئین‌ها را نشان می‌دهند. پیک کوچکی با جذب ۲/۵ در محدوده cm^{-1} ۲۹۰۰ مشاهده شدکه بر اساس نظر Cabado و همکاران (۲۰۱۵) و Torres-Giner و همکاران (۲۰۱۷) مربوط به گروه کششی C-H است. گروه C-H یکی از بخش‌های اصلی ساختار آمینواسیدها است.



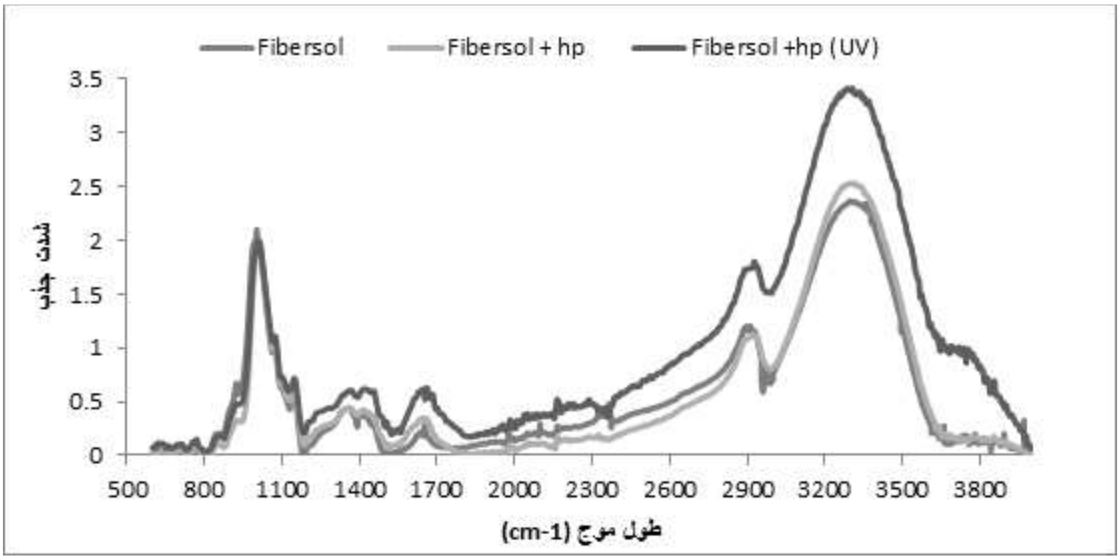
شکل ۱- نمودار FTIR پروتئین هیدرولیز شده در شرایط قبل و بعد از قرارگیری آن در معرض اشعه UV.

پیک بزرگ و پهنی با جذب ۳/۵ در محدوده cm^{-1} ۳۵۰۰–۳۰۰۰ مشاهده شد. در منابع پژوهشی متعددی این محدوده به باند هیدروژنی در گروه کششی N-H و گروه خمشی C-H نسبت داده شده است (Kanbargi *et al.*, 2017؛ Torres-Giner *et al.*, 2017؛ Pavia *et al.*, 2002). پس از قرارگیری پروتئین هیدرولیز شده در معرض اشعه UV به‌عنوان عامل تخریب کننده، تغییر قابل توجهی در نمودار طیف‌سنجی FTIR آن به وجود آمد. این تغییرات در شکل ۲۲ قابل مشاهده است. پیک‌های کوچکی که در محدوده های cm^{-1} ۸۵۰ و cm^{-1} ۱۰۰۰ دیده می‌شد، پس از قرار گیری در معرض UV کاملا حذف شد. شدت جذب در ناحیه cm^{-1} ۱۰۵۰کاهش یافت و پیک حاصله بسیار

کوچکتر شد. دلیل این امر را می‌توان به تخریب شدن باندهای گروه آمیدی و یا اکسایش برخی ترکیبات نسبت داد (Alp Erbay *et al*., 2017). در ناحیه cm^{-1} ۱۷۰۰ -۱۵۰۰ در مرکز پیک پروتئین هیدرولیز شده کاهش شدت جذب ایجاد شده و می‌توان دو پیک مجزای کوچک در آن ناحیه مشاهده کرد. از بین رفتن باندهای هیدروژنی در ساختار دوم پروتئین‌ها از جمله باز شدن مارپیچ آلفا یا جدا شدن دو رشته پلی‌پپتیدی و از بین رفتن ساختار صفحه‌ای بتا را به‌عنوان دلایل احتمالی این کاهش شدت جذب می‌توان ذکر کرد (Sullivan *et al*., 2014). همانطور که در شکل ۱ مشخص است بزرگترین پیک که در ناحیه cm^{-1} ۳۵۰۰ -۲۹۰۰ قرار داشت، پس از قرارگیری در معرض UV کاهش چشمگیری پیدا کرد. این کاهش در شدت جذب در این ناحیه را می‌توان به شکسته شدن و تخریب باندهای هیدروژنی موجود در گروه‌های آمیدی از جمله گروه کششی N-H و گروه خمشی C-H نسبت داد (Torres-Giner *et al*., 2017).

در شکل۲ نمودار FTIR فایبرزول و پروتئین‌های هیدرولیزشده ریزپوشانی شده در فایبرزول و همچنین پس از قرار گیری آن در معرض اشعه UV نشان داده شده است. اولین پیک که در ناحیه cm^{-1} ۱۱۷۰ -۸۵۰ شدت جذبی در حدود ۲ را نشان داد که مربوط به ارتعاشات کششی انهیدروگلوکز بود. ارتعاشات کششی بین واحدهای گلوکز اتصال یافته، در ناحیه کمتر از cm^{-1} ۱۰۰۰ جذب نشان می‌دهند (Cabado *et al*., 2015). در ناحیه cm^{-1} ۳۰۰۰- ۲۸۵۰ پیک با شدت جذب ۱ مشاهده شد که به تغییر شکل گروه C-H نسبت داده شده است (Torres-Giner *et al*., 2017 ؛Cabado *et al*., 2015). پیک بزرگ و پهنی با شدت جذب ۲/۵ در ناحیه cm^{-1} ۳۵۰۰ -۳۰۰۰ مشاهده شد که بر اساس نظر پژوهشگران به گروه O-H نسبت دارد (Cabado *et al*., 2015؛ اسدپور و همکاران، ۲۰۱۶).

مقایسه نمودار کپسول‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده با نمودارفایبرزول در شکل ۲ نشان می‌دهد که پیک‌های موجود در محدوده cm^{-1} ۱۷۰۰ -۸۵۰ تقریبا بدون تغییر باقی مانده‌اند. اما پیکی که شروع آن از ناحیه cm^{-1} ۲۰۰۰ بود و تا ناحیه cm^{-1} ۳۰۰۰ ادامه یافته بود، کمی شدت جذب آن درنمودار کپسول‌ها کاهش یافت. این کاهش را می‌توان به دلیل تشکیل کمپلکس بین ترکیب پلی‌ساکاریدی دیواره و ترکیب پروتئینی هسته نسبت داد که با نتایج Torres-Giner و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت. آنها اعلام کردند الحاق پلی‌ساکارید و پروتئین باعث کاهش شدت جذب مربوط به باند کششی C-H گردید. برعکس شدت جذب بزرگترین پیک در ناحیه cm^{-1} ۳۵۰۰ -۳۰۰۰ در مقایسه با نمودار فایبرزول، مقداری افزایش یافت. حضور گروه O-H مربوط به پلی‌ساکارید فایبرزول موجود در دیواره و همچنین حضوره باندهای کششی N-H و خمشی C-H که مربوط به گروه‌های آمیدی موجود در پروتئین هیدرولیز شده هستند، باعث افزایش شدت جذب در ناحیه ی مذکور شده است. López-Rubio و Lagaron (۲۰۱۲) نیز اعلام کردند حضور همزمان گروه‌های OH، NH و CH موجود در ترکیبات پروتئینی و پلی‌ساکاریدی باعث افزایش باندهای هیدروژنی درون مولکولی و بین مولکولی شده و شدت جذب را در ناحیه cm^{-1} ۳۳۶۰ -۳۳۴۰ افزایش داد.



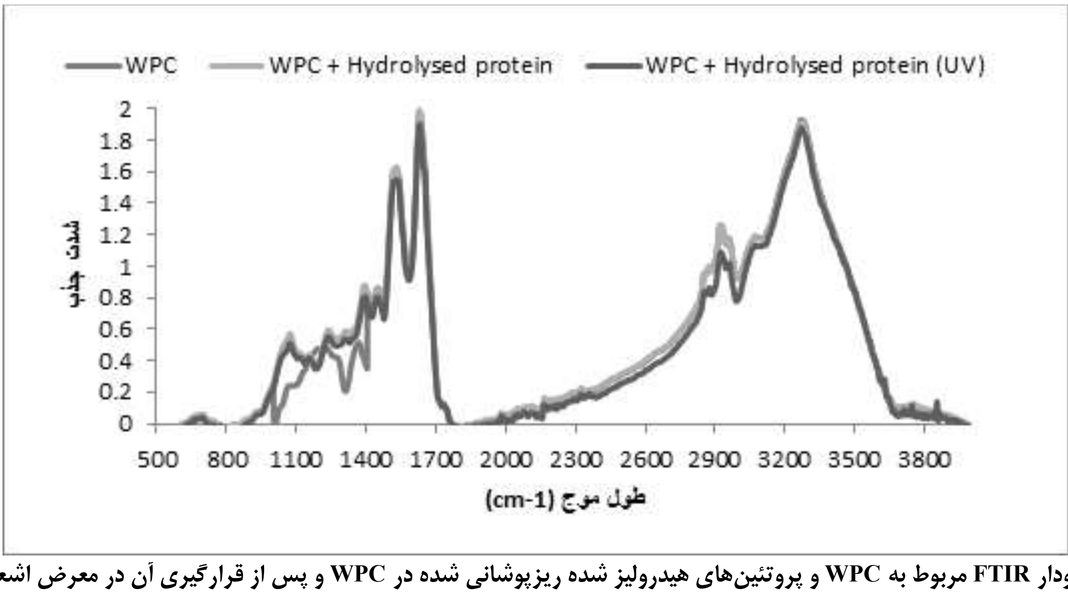
شکل ۲- نمودار FTIR فایبرزول و پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در فایبرزول و پس از قرار گیری آن در معرض اشعه UV.

در شکل ۲ مشخص است که بعد از قرارگیری پروتئین هیدرولیز شده ریزپوشانی شده با فایبرزول در معرض اشعه UV، افزایش شدت جذب به ویژه در نواحی cm^{-1} ۳۵۰۰ -۱۵۰۰ اتفاق افتاد. بر اساس نظر Khandal و همکاران (۲۰۱۳) قرار گیری فایبرزول در معرض تابش

اشعه باعث تحریک تشکیل اتصالات عرضی در فایبزول می‌گردد. افزایش پیوندهای تشکیل شده در بین زنجیره‌های پلی‌ساکاریدی احتمالا باعث ایجاد شبکه‌هایی برای احاطه‌ی بیشتر مولکول‌های پروتئینی و الحاق بیشتر آنها به مولکول‌های پلی‌ساکارید گشته است. در نتیجه احتمالا افزایش پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی باعث افزایش شدت جذب گردیده است. نمودار FTIR مربوط به WPC و پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در WPC و پس از قرار گیری آن در معرض اشعه UV در شکل ۳ نشان داده شده است. در نمودار WPC پیک‌هایی با شدت جذب‌های مختلف در ناحیه cm^{-1} ۱۷۰۰ –۸۵۰ مشاهده شد که مربوط به باندهای مربوط به گروه آمیدی از جمله گروه خمشی N-H، C-N و C=O است (Van der Ven *et al.*, 2002؛ شیرازی و همکاران، ۱۳۸۴). همچنین ممکن است برخی از پیک‌های ریز تر در این محدوده مربوط به گروه‌های موجود در زنجیره جانبی برخی اسیدهای آمینه باشد. دو پیک شاخص در ناحیه cm^{-1} ۱۶۰۰–۱۵۰۰ و cm^{-1} ۱۷۰۰–۱۶۰۰ ناشی از ارتعاش آمید II و ارتعاش آمید I می‌باشدکه به‌ترتیب مربوط به باندهای N-H و C-N و باند C=O می‌باشد. در واقع جذب در این ناحیه بیان کننده ساختمان دوم پروتئین‌ها می‌باشد که مهم‌ترین آن ساختار صفحه ای بتا و مارپیچ آلفا هستند (Wang *et al*., 2013؛ لوپز روبیو و ماگارون، ۲۰۱۲؛ اسدپور و همکاران، ۲۰۱۶). پیک نسبتا کوچکی در محدوده cm^{-1} ۳۰۰۰ –۲۸۰۰ مشاهده شد که مربوط به گروه کششی C-H است. پیک نسبتا بزرگ و پهنی در محدوده cm^{-1} ۳۵۰۰–۳۰۰۰ مشاهده شد که به باند هیدروژنی در گروه کششی N-H و گروه خمشیC-H نسبت دارد (López-Rubio and Lagaron, 2012؛ Torres-Giner *et al.*, 2017؛ Kanbargi *et al.*, 2017).

نمودار FTIR مربوط پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در WPC در شکل ۳ مشخص است. با توجه به اینکه در این کپسول دیواره و هسته هر دو از جنس پروتئین هستند، پیک‌های موجود در این نمودار تفاوت چندانی با نمودار FTIR مربوط به WPC نداشت. این نتیجه با آنچه Gómez-Mascaraque و López-Rubio (۲۰۱۶) اعلام کردند کاملا مطابقت داشت. آنها به‌منظور ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده از ژلاتین استفاده کردند. نتایج نشان داد که نمودار FTIR پروتئین هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در ژلاتین، اختلاف معنی‌داری با نمودار FTIR ژلاتین نداشت.

در نمودار FTIR مربوط پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در WPC بعد از قرارگیری در معرض UV (شکل ۳)، به جز یک کاهش جزئی شدت جذب در ناحیه cm^{-1} ۳۰۰۰ –۲۸۰۰ پس از قرارگیری در معرض UV ، تفاوت قابل ملاحظه ای با قبل از قرارگیری ریزکپسول‌ها در معرض UV نشاهده نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت WPC، زیست پلیمر مناسبی برای ریزپوشانی هیدرولیزشده‌های پروتئینی و محافظت از آنها در مقابل عوامل تخریب کننده است. این نتیجه با نتایج Torres-Giner و همکاران (۲۰۱۷) و López-Rubio و Lagaron(۲۰۱۲) مطابقت داشت.

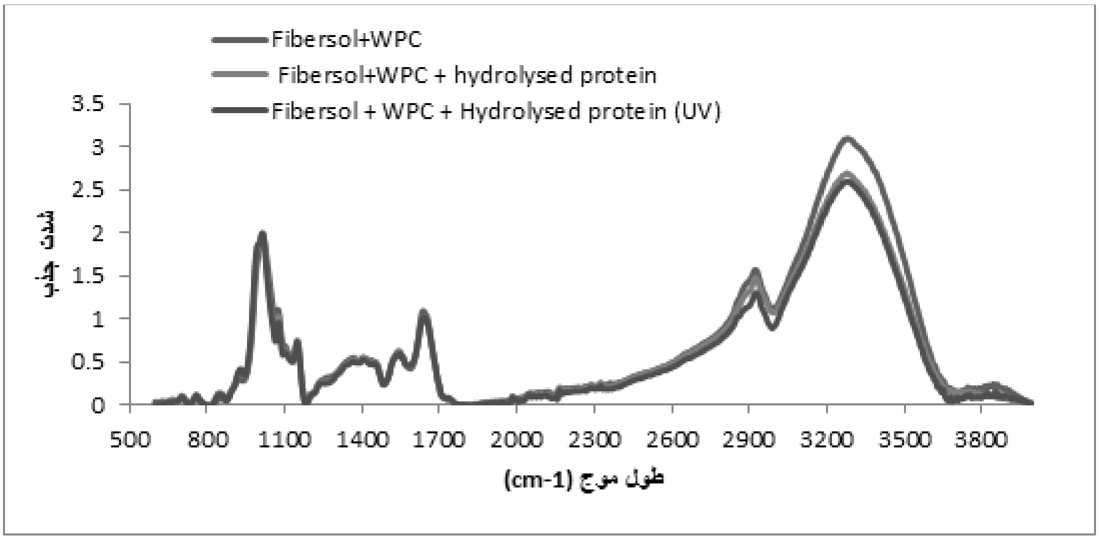


شکل ۳- نمودار FTIR مربوط به WPC و پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در WPC و پس از قرارگیری آن در معرض اشعه UV.

همانطور که در نمودار FTIR ترکیب WPC و فایبرزول (شکل ۴) قابل مشاهده است، در ناحیه cm^{-1} ۱۱۷۰ –۸۵۰ شدت جذب حدود ۲ دیده شد که در مقایسه با فایبرزول، کمی کاهش جزئی و نسبت به WPC افزایش وجود داشت. در ناحیه cm^{-1} ۱۷۰۰ –۱۵۰۰ دو پیک مجزا با ارتفاع نزدیک به ۱ مشاهده شد. پیک‌ها شدت جذبی بیشتر از فایبرزول و کمتر از WPC از خود نشان دادند. در ناحیه cm^{-1} ۳۰۰۰–۲۸۵۰ پیک مشاهده شد که نسبت به پیک‌های فایبرزول و WPC در همین ناحیه افزایش جزئی شدت جذب داشت. در ناحیه

۳۵۰۰-۳۰۰۰cm-1 پیک با شدت جذب حدود ۳ مشاهده شد که نسبت به پیک‌های فایبرزول و WPC در همین ناحیه افزایش مشاهده شد. همانطور که مشخص است پیک‌های موجود در نمودار طیف‌سنجی FTIR ترکیب فایبرزول و WPC برآیندی از پیک‌های فایبرزول و WPC بود. همچنین تغییرات جزئی در محل ظاهر شدن پیک‌ها در نمودار طیف‌سنجی FTIR ترکیب فایبرزول و WPC مشاهده شد که به دلیل برقراری پیوندهای هیدروژنی و نیروی الکتروستاتیک در بین پلی ساکارید فایبرزول و WPC بوده است. این باندهای هیدروژنی و پیوندهای الکتروستاتیک باعث تغییر فرکانس باندهای O-H ،N-H، C=O ،C=N و C-H می‌گردد (Su *et al.*, 2011). همچنین در این رابطه Liu و همکاران (۲۰۱۴) و Wang و همکاران (۲۰۱۳) اعلام کردند که گلایکاسیون[1] وی پروتئین باعث افزایش یا کاهش ساختارهای مارپیچ آلفا، صفحه‌ای بتا و چرخشی بتا و مارپیچ تصادفی می‌گردد.

همچنین در نمودار FTIR پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در ترکیب WPC و فایبرزول پس از قرارگیری در معرض اشعه UV (شکل ۴) تغییری حاصل نشد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت ترکیب WPC و فایبرزول، زیست پلیمر ترکیبی مناسبی برای ریزپوشانی هیدرولیز شده‌های پروتئینی و محافظت از آنها در مقابل عوامل تخریب کننده است. این نتیجه با نتایج Rosenberg و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت. Rosenberg و همکاران (۲۰۱۶) اعلام کردند کمپلکس پروتئین و فایبرزول ترکیب مناسبی به‌منظور استفاده در دیواره ریزکپسول‌ها بوده و باعث بهبود ویژگی‌های محافظتی دیواره می‌گردد.



شکل ٤- نمودار FTIR مربوط به WPC و فایبرزول و پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزپوشانی شده در آن، قبل و پس از قرار گیری آن در معرض اشعه UV.

بررسی ساختار ریزکپسول‌ها با استفاده از SEM

در شکل ۵ تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی نشان شداده شده است. قطر همه ریزکپسول‌های تهیه شده با دیواره‌های مختلف در این پژوهش با کمک میکروسکوپ الکترونی بین ۱/۵۳ تا ۵/۶۳ میکرومتر اندازه‌گیری شد. نسبت ماده دیواره به هسته از عوامل موثر بر اندازه ذرات ریزکپسول‌ها می‌باشد. حسین‌زاده و همکاران (۱۳۹۴) و Frascareli و همکاران (۲۰۱۲) دریافتند هرچه غلظت دیواره بیشتر شود امولسیون حاصل دارای اندازه ذرات کوچکتر و ریزکپسول حاصل اندازه ذره بزرگتری دارد. در این حالت با حداکثر توانایی، محافظت از قطرات در برابر تجمع و بهم چسبیدن را در طی فرآیند ریزپوشانی اعمال می‌گردد (Jafari *et al.*, 2007). در پژوهش حاضر به‌کارگیری نسبت ۹۰ به ۱۰ دیواره به هسته، بزرگتر بودن سایز میکروذرات به‌دست آمده را توجیه می‌کند. حجتی و همکاران (۱۳۹۲) اعلام کردند نوع ماده به‌کار رفته در دیواره نیز بر اندازه ریزکپسول‌ها موثر است. به‌کارگیری ترکیباتی مانند انواع کربوهیدرات‌ها که باعث افزایش ویسکوزیته امولسیون اولیه می‌گردند، منجر به تولید ریزکپسول‌های ریزتر می‌گردد. تصاویر به‌دست آمده از میکروسکوپ الکترونی در این پژوهش نیز نشان داد که اندازه ذرات ریزتر مربوط به ریزکپسول‌های دارای دیواره فایبرزولی بودند. همچنین ریزکپسول‌های با دیواره WPC بزرگترین اندازه ذرات را داشتند.

بر اساس شکل ۵، ریزکپسول‌های تهیه شده با دیواره فایبرزول تقریبا کروی شکل بوده و برخی از آنها دارای تورفتگی و چروک در

---

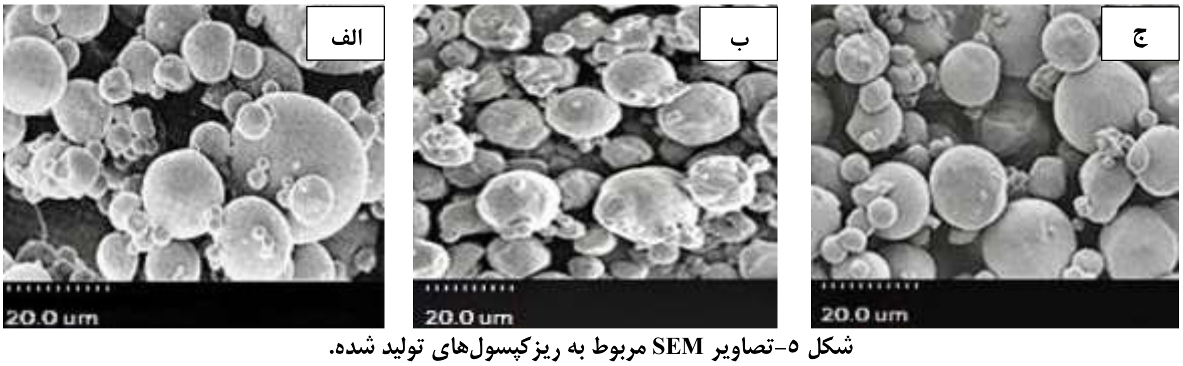
1 Glycation

سطح می‌باشند. یکی از عوامل تورفتگی یا چروکیدگی در سطح ریزکپسول‌ها، به دمای بالای ورودی خشک‌کن و تبخیر سطحی آن نسبت داده شد است (Drusch and Berg, 2008). ایجاد چنین حفره‌هایی جزء ویژگی‌های ریزکپسول‌های تهیه شده با روش خشک‌کن پاششی و به‌ویژه تهیه شده با دیواره کربوهیدراتی ذکر شده است که به دلیل افزایش دمای ذره و افزایش فشار بخار ایجاد می‌گردد (Nijdam and langrish, 2006 ؛ Rosenberg *et al.*, 2016).

تجمع میکرو ذرات پودر شده در ریزکپسول‌های با دیواره فایبرزول بیشتر از دو دیواره دیگر بود که با نتایج Mok و Park (۲۰۰۸) مطابقت دارد. آنها اعلام کردند ریزکپسول‌هایی که در دیواره آنها کربوهیدرات استفاده شده باشد، در طی فرآیند خشک کردن پاششی ممکن است ذوب شدن دیواره رخ بدهد و تجمع پودرهای خشک شده را به علت چسبیدن آنها به یکدیگر شاهد باشیم.

بر خلاف ریزکپسول‌های تهیه شده با دیواره فایبرزول، ریزکپسول‌های تهیه شده با پروتئین آب پنیر ساختار صاف و بدون چروک و بدون ترک داشتند که با نتایج Molina و همکاران (۲۰۰۹)، Rosenberg و همکاران (۲۰۱۶) و Assadpour و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت. Molina و همکاران (۲۰۰۹) به‌منظور ریزپوشانی کازئین هیدرولیز شده، از یک ماده پروتئینی (پروتئین سویا) استفاده کردند. آنها اعلام کردند ریزکپسول‌ها سطحی کاملا صاف و بدون فرسایش و ترک بودند. این ویژگی‌ها باعث جلوگیری از نفوذ گازها و رطوبت به داخل ریزکپسول شده و قابلیت حفاظت بالای آن را در مقابل عوامل تخریبی تایید می‌کند. Oliveira و همکاران (۲۰۰۷) و Rosenberg و همکاران (۲۰۱۶) اعلام کردند استفاده از پروتئین و ترکیب پروتئین و کربوهیدرات به‌عنوان ماده دیواره‌ای باعث تولید کپسول‌هایی با مقاومت مکانیکی بالا در مقابل عوامل تخریبی می‌گردد. در چنین سامانه‌هایی، پروتئین به‌عنوان عامل امولسیون‌کننده و تشکیل‌دهنده لایه و کربوهیدرات‌ها از جمله فایبرزول و مالتودکسترین یا شربت ذرت به‌عنوان ماده تشکیل دهنده شبکه ایفای نقش می‌کنند (Rosenberg *et al.*, 1996).

در پژوهش حاضر نیز ریزکپسول‌های تهیه شده با دیواره ترکیبی فایبرزول و WPC، نسبت به ریزکپسول‌های با دیواره فایبرزول تنها، دیواره صاف‌تر و کم چروک‌تری داشتند. همچنین رضوی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) از مخلوط پروتئین آب پنیر و کربوهیدرات‌ها از جمله فایبرزول و مالتودکسترین به‌عنوان ماده دیواره ای در فرآیند ریزپوشانی روغن سبوس برنج با روش خشک کن پاششی استفاده کردند. تصاویر SEM ریزکپسول‌ها نشان داد میکرو کپسول‌هایی که دارای دیواره مخلوط پروتئین آب پنیر و کربوهیدرات بودن، دیواره صاف و یکنواخت‌تری نسبت به ریزکپسول‌های با دیواره کربوهیدرات تنها بودند. رضوی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) اعلام کردند که در فرآیند از دست دادن آب، ساختار کروی، بدون چروک و یکنواخت ریزکپسول‌ها مولکول‌های به دام افتاده در مرکز کپسول یا همان هسته، در برابر عواملی مانند اکسیژن و دما محافظت می‌شوند. از طرفی مشخص شده است که بکارگیری ترکیبی کربوهیدرات و پروتئین در ساختار دیواره، به دلیل افزایش مقاومت گرمایی پروتئین‌ها و کاهش میزان دناتوره شدن آنها باعث افزایش کارایی کپسول‌ها و حفظ بیشتر ساختار ظاهری آنها می‌گردد (Avadi *et al.*, 2010). در این زمینه Su و همکاران (۲۰۱۱) نیز اعلام کردند که با افزایش نسبت پروتئین به کربوهیدرات در دیواره، اندازه و تعداد ترک‌های دیواره کاهش یافت و ساختار میکروذرات مقاوم‌تر گردید.



شکل ۵-تصاویر SEM مربوط به ریزکپسول‌های تولید شده.
الف: ریزکپسول‌های WPC حاوی پروتئین هیدرولیز شده
ب: ریزکپسول‌های فایبرزول حاوی پروتئین هیدرولیز شده
ج: ریزکپسول‌های ترکیب فایبرزول و WPC حاوی پروتئین هیدرولیز شده

راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی اندازه‌گیری شده برای میکروکپسول‌های آماده شده با مواد دیواره‌ای حاوی مخلوط فایبرزول و WPC، WPC و فایبرزول به‌ترتیب ۱/۵ ±۸۱/۷۰، ۲/۲±۷۷/۳۱ و ۳/۱ ±۶۶/۷۶ درصد بود. کپسول‌های با دیواره‌های مختلف راندمان ریزپوشانی متفاوتی نشان دادند. به‌طوری که ریزکپسول‌های با دیواره مخلوط فایبرزول و WPC

بیشترین میزان راندمان ریزپوشانی و ریزکپسول‌های با دیواره فایبرزولی کمترین میزان راندمان ریزپوشانی را نشان دادند. میزان کم SPC در سطح ذرات با دیواره مخلوط فایبرزول و WPC و WPC در افزایش پایداری و انبارمانی پروتئین هیدرولیز شده ریزپوشانی شده بسیار مهم است (Muangrat *et al*., 2019). این مسئله با نتایج آنتی‌اکسیدانی به‌دست آمده در این پژوهش نیز مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر ریزپوشانی پروتئین هیدرولیز شده گرده زنبورعسل مقاومت آن را در برابر اشعه UV، به‌عنوان عامل تخریب کننده، افزایش داد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از ارزیابی فعالیت مهار رادیکال DPPH، تصاویر SEM و اسپکتروسکوپی FTIR ریزکپسول‌ها در طول مدت زمان در معرض قرارگیری اشعه UV، و همچنین راندمان ریزپوشانی می‌توان نتیجه گرفت که در میان WPC، فایبرول و مخلوط WPCو فایبرزول، مخلوط WPCو فایبرزول بهترین ترکیب دیواره با قابلیت محافظت‌کنندگی مناسب برای ریزپوشانی پروتئین‌های هیدرولیز شده گرده در مقابل اشعه UV بود. این ریزپسول‌ها پایداری قابل قبول و حداقل تخریب را از خود نشان داده و در طول در معرض قرارگیری با UV فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را حفظ کردند. از این رو می‌توان گفت عملکرد بیولوژیکی پروتئین هیدرولیز شده گرده نیز می‌تواند با استفاده از این روش حفظ گردد.

بررسی گسترده‌تر ریزپوشانی پپتیدها یا هیدرولیز شده‌ها از منابع مختلف پروتئینی و به‌کارگیر میکروکپسول‌های تولید شده در فرمولاسیون‌های مختلف مواد غذایی از جمله پیشنهادات حاصل از این پژوهش می‌باشد. همچنین توجه و بررسی بیشتر محصولات جانبی دیگر زنبور عسل و بکارگیری آنها در فرمولاسیون‌های غذایی پیشنهاد می‌گردد.

منابع

شیرازی، س. ف.، فرهادی، ا.، وکیلی، ن. ۱۳۸۴. مروری بر طیف سنجی مادون قرمز و کاربرد آن در علوم پزشکی. مجله پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهیدبهشتی. دوره ۲۹، شماره۴، ص ۳۷۹–۳۸۶.

حجتی، م.، رضوی، ه.، رضایی، ک.، گیلانی، ک. ۱۳۹۲. اثر ترکیب دیواره بر ویژگی‌های کانتاگزانتین طبیعی ریزپوشانی‌شده به روش خشک کن پاششی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، دوره ۸، شماره ۳، ص ۵۴– ۴۵.

حسین‌زاده، س.، حداد خداپرست، م. ح.، بستان، آ.، محبی، م. ۱۳۹۴. ریزپوشانی روغن نعناع به روش خشک کردن پاششی. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی ایران، جلد ۱۲، شماره ۴، ص ۵۱۱– ۴۹۹.

رضوی زاده، ب.، خان محمدی، ف.، عزیزی، س. ن. ۱۳۹۳. مقایسه ریزکپسول‌های روغن سبوس برنج تهیه شده با خشک‌کن پاششی و خشک‌کن انجمادی. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. جلد۳، شماره ۲، ص ۱۱۴– ۹۷.

Alp Erbay, E., Dağtekin, B. B. G., Türe, M., Yeş ilsu, A. F., Torres-Giner, S. 2017. Quality improvement of rainbow trout fillets by whey protein isolate coatings containing electrospun poly (ε-caprolactone) nanofibers with*Urtica dioicaL.* extract during storage. *LWT−Food Science Technology*, 78, 340−351.

Assadpour, E., Jafari, S. M., Maghsoudlou, Y. 2016. Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectinwhey protein nano-capsules, *International Journal of Biological Macromolecules*, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.023.

Avadi, M. R., Mir Mohammad Sadeghi, A., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Rafiee-Tehrani, M. 2010. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine :Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6 (1), 58–63.

Cabado, M. C., Parra-Ruiz, F. J., Casado, A. L., Román, S. 2015. Thermal Crosslinking of Maltodextrin and Citric Acid. Methodology to Control the Polycondensation Reaction under Processing Conditions. *Polymers & Polymer Composites*, 24, 8, 643- 654.

Chen, Q., McGillivray, D., Wen, J., Zhong, F., Quek, S.Y. 2013. Co-encapsulation of fish oil with phytosterol ester and limonen by milk proteins. *Journal of Food Engineering*, 117, 4, 505–512.

Drusch,S., Berg, S. 2008. Extractable oil in microcapsules prepared by spray-drying,determination and impact on oxidatve stability. *Food Chemistry*, 109, 17-24.

Frascareli, E., Silvaa, V., Tonona. R., Hubingera, M. 2012. Effect of process conditions on the microencapsul ation of coffee oil by spray drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 413-424.

Gómez-Mascaraque, L. G., López-Rubio, A. 2016. Protein-based emulsion electrosprayed micro- and submicroparticles for the encapsulation and stabilization of thermosensitive hydrophobic bioactives. *Journal of Colloid Interface Science*, 465, 259−270.

Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., Nasri, M. 2011. Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins hydrolyzed by Bacillus mojavensis A21 proteases. *Food Research International*, 44, 2703-2711.

Jafari, S.M., He, T., Bhandari, B. 2007. Encapsulation of nanoparticles of D-limoneneby spray drying: Role of emulsifiers and emulsifying techniques. *Drying Technology*, 25, 1079–1089.

Kanbargi, K.D, Sachin, K., Sonawane, S., Shalini, S., Arya, A. 2017. Encapsulation Characteristics of Protein Hydrolysate Extracted from Ziziphus jujube seed, *International Journal of Food Properties*, DOI: 10.1080/10942912.2017.1282516.

Khandal, D., Mikus, P. Y., Dole, P., Coqueret, X. 2013. Radiation processing of thermoplastic starch by blending aromatic additives: Effect of blend composition and radiation parameters. *Radiation Physics and Chemistry*, 84, 218–222.

Liu, R., Zheng, W., Li, J., Wang, L., Wu, H., Wang, X., Shi, L. 2014. Rapid identification of bioactive peptides with antioxidant activity from the enzymatic hydrolysate of Mactra veneriformis by UHPLC–Q-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry*, *167*, 484-489.

López-Rubio, A., Lagaron, J. M. 2012. Whey protein capsules obtained through electrospraying for the encapsulation of bioactives. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 13, 200–206.

Maqsoudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mora, L., Mohebodini, H., Toldra, F.,Ghorbani, M. 2018. Peptide identification in alcalase hydrolysated pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food Research International,116*, 905- 915.

Mohan, A., McClements, D. J., Udenigwe, C. C. 2016. Encapsulation of bioactive whey peptides in soy lecithin-derived nanoliposomes: Influence of peptide molecular weight. Food Chemistry, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.075.

Mok, H. and Park, T. G. 2008. Water-free microencapsulation of proteins within PLGA microparticles by spray drying using PEG-assisted protein solubilization technique in organic solvent. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 70, 137–144.

Molina Ortiz, S. E., Mauri, A., Monterrey-Quintero, S. E., Trindade, M. A., Santana, A. S., Favaro-Trindade, S. C. 2009. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *LWT - Food Science and Technology,* 42, 919–923.

Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., & Singh, H. 2006. Review: Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture,* 86, 2038-2045.

Muangrat, R., Ravichai, K., Jirarattanarangsri, W. 2019. Encapsulation of polyphenols from fermented wastewater of Miang processing by freeze drying using a maltodextrin/gum Arabic mixture as coating material. J. Food Process. Preserv.

Nijdam, J. J., langrish,T.A. 2006. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. *Journal of Food Engineering,* 77, 4, 919-925.

Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O.,& Favaro-Trindade, C. S. 2007. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L.acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, 25, 10, 1687–1693.

Pai, D. A., Vangala, V. R., WeiNg, J., KiongNg, W., & Tanac, R. B. H. 2015. Resistant maltodextrin as a shell material for encapsulation of naringin: Production and physicochemical characterization. *Journal of Food Engineering,* 161, 68-74.

Patsialas, K., Papaioannou, E. H., Liakopoulou-Kyriakides, M. 2012. Encapsulation of the peptide Ac–Glu–Thr–Lys–Thr–Tyr–Phe–Trp–Lys–NH2into polyvinyl alcohol biodegradable formulations—Effect of calcium alginate. *Carbohydrate Polymers,* 87, 1112– 1118.

Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., Vyvyan, J. A. 2002. Introduction to Spectroscopy. 3th Edition, Books/ Colne. 579p.

Pudziuvelyte, L., Marksa, M., Jakstas, V., Ivanauskas, L., Kopustinskiene, D. M., and Bernatoniene, J. 2019. Microencapsulation of Elsholtzia ciliata Herb Ethanolic Extract by Spray-Drying: Impact of Resistant-Maltodextrin Complemented with Sodium Caseinate, Skim Milk, and Beta-Cyclodextrin on the Quality of Spray-Dried Powders. *Molecules,* 24, 1461. doi:10.3390/molecules24081461

Rosenberg, M., Rosenberg, Y and Frenkel, F. 2016. Microencapsulation of model oil in wall matrices consisting of SPI and maltodextrins. *AIMS Agriculture and Food*, 1, 1, 33-51.

Rosenberg, M., & Sheu, T.Y. 1996. Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. *International Dairy Journal*, 6, 273–284.

Dehkordi, S.S., Alemzadeh, I., Vaziri, A.S., Vossoughi, A. 2020. Optimization of Alginate-Whey Protein Isolate Microcapsules for Survivability and Release Behavior of Probiotic Bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* 190, 182–196. https://doi.org/10.1007/s12010-019-03071-5.

Shen, Q. and Quek, S. Y. 2014. Microencapsulation of astaxanthin with blends of milk protein and fiber by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 123,165–171.

Sonawane, S. K., Arya S. S. 2015. Effect of drying and storage on bioactive components of jambhul and wood apple. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 2833- 2841.

Su, R., Zhu, X., Fan, D., Mia, Y., Yang, C. Y., Jia, X. 2011. Encapsulation of probiotic Bifidobacterium longum BIOMA 5920 with alginate–human-like collagen and evaluation of survival in simulated gastrointestinal. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49, 979–984.

Sullivan, S. T., Tang, C., Kennedy, A., Talwar, S., Khan, S. A. 2014. Electrospinning and heat treatment of whey protein nanofibers, *Food Hydrocolloids*, 35, 36−50.

Torres-Giner, S., Wilkanowicz, S., Melendez-Rodriguez, B., Lagaron, J. M. 2017. Nanoencapsulation ofAloe verain Synthetic and Naturally Occurring Polymers by Electrohydrodynamic Processing of Interest in Food Technology and Bioactive Packaging, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 65, 4439- 4448.

Van der Ven, C. Muresan, S., Gruppen, H., Bont, D., Merck, K. B., Voragen, A. G. J. 2002. FTIR Spectra of Whey and Casein Hydrolysates in Relation to Their Functional Properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *50*, 24, 6943–6950.

Wang, J., Su, Y., Jia, F., Jin, H. 2013. Characterization of casein hydrolysates derived from enzymatic hydrolysis. *Chemistry Central Journal*, 7, 62, 212- 220.

Zavareze, E., Campello Telles, A., Lisie, S., Rocha, M. D., Colussi, R., Marques de Assis, L., Suita de Castro, L. A., Guerra Dias, A. R., Prentice-Hernández, C. 2014. Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (*Micropogonias furnieri*) muscle and byproduct. *LWT - Food Science and Technology.* doi: 10.1016/j.lwt.2014.05.013.

Zhong, Y., Visalakshi, A., Esther, H., Patricia, W., and Suzanne, H. 2015. Soluble dietary fiber (Fibersol-2) decreased hunger and increased satiety hormones in humans when ingested with a meal. *Nurition Research, 35*,5, 393-400.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 17, No. 2, June. July. 2021, p. 409- 421

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۷، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۰ ص.۴۲۱-۴۰۹

Microencapsulation of bee pollen protein hydrolysate by whey protein concentrate and fibersol and evaluation of stability and structure of microcapsules

H. Mohebodini[1*], A. Maqsoudlou[2]

Received: 2020.05.30
Accepted: 2020.07.27

Introduction: Microencapsulation is the most commonly used method of preserving proteins and peptides, which increases the stability in different conditions. Bee pollen with 10–40% protein, is a valuable source of protein that has functional and nutraceutical properties. By hydrolysis and producing bioactive peptides, their functional and health effects will be improved. Fibersol is a dietary fiber that can be used in many foods and supplements. This carbohydrate compound is actually non-digestible maltodextrin and has recently been used as a wall material in encapsulation. Few studies have conducted on the microencapsulation of hydrolysed proteins and their stability during accelerated conditions. On the other hand, by-products of honey bees such as pollen have been less noticed; therefore the aim of this study was the microencapsulation of bioactive bee pollen protein hydrolysate by fibersol and WPC and to study the changes of structure and stability of resulted microcapsules during the exposure to UV radiation.

Material and Methods: Bee pollen was hydrolysed by Alcalase (1.5%) for 4 h in shaking incubator. The protein hydrolysate was microencapsulated using WPC, fibersol, and their combination by spray drying. The wall materials and hydrolysed protein were used in ratio of 10:1 (w/w). WPC 2%, fibersol 2%, as well as WPC and fibersol mixtures with 1:3 ratio, were the wall materials. For accelerating the oxidation reactions, the obtained capsules were exposed to UV radiation for 48 h. During the exposure to UV radiation, the DPPH radical scavenging activity of microcapsules and hydrolysed protein was measured. Interactions between hydrolysed protein compounds, WPC and fibersol were identified by the FTIR spectroscopy. The SEM was used to investigate the morphology of the microcapsules.

Results & Discussions: Almost at all experimental time, the highest DPPH radical scavenging during exposure to UV radiation was related to the capsules prepared using fibersol and WPC mixture and after that the capsule with WPC as wall material. The FTIR spectroscopy of the hydrolysed protein was changed significantly when it was exposed to UV radiation. This change caused by losing the hydrogen bonds in the secondary structure of proteins, including the separation of two polypeptide chains or the opening of the αhelix and loss of β-sheet structure. The FTIR profile of capsulated hydrolysed protein by fibersol showed that the adhesion of protein and polysaccharide changed the absorbance of C–H bending and N–H stretching bands of amide groups in the hydrolysed protein in 3000–3500 cm^{-1} and the stretching band of C–H and O–H group in the region of 2000–3000 cm^{-1} for fibersol in the wall. After exposure to UV, because of cross-linking in fibersol and more involving the molecules of fibersol to protein, the absorbance was increased in the region of 1500–3500 cm^{-1}. The number of peaks and absorbance in the FTIR spectra of hydrolysed proteins microencapsulated in WPC were more than number of peaks and absorbance in the FTIR spectra of WPC. There was no significant difference in the FTIR spectra of hydrolysed protein encapsulated with WPC before and after exposure to UV. The peaks in FTIR spectra of hydrolysed protein microencapsulated with the mixture of WPC and fibersol, showed higher absorbance level than the peaks of fibersol and lower than peaks of WPC. None of the peaks of microencapsuls with the wall of mixture of WPC and fibersol, were changed after exposure to UV radiation. Results of SEM showed that the microcapsules prepared with mix of fibersol and WPC had a uniform and smoother wall than microcapsules prepared with only fibersol. Finally, the mix of WPC and fibersol was selected as the best wall with a proper protective ability for the microencapsulation of hydrolysed proteins and protection against UV radiation.

Keyword: Pollen protein hydrolysate, Microencapsulation, Spray drying, Fibersol, Whey protein concentrate

Department of Animal Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
Department of Food Science and Technology, Gorgan university of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
(*Corresponding Author Email: h.mohebodini@uma.ac.ir)